



HOMOGENEOUS PHASE GENE MICROARRAY**BEST AVAILABLE COPY****Publication number:** WO03019189**Publication date:** 2003-03-06**Inventor:** CAO WEI (CN); LI WENQUAN (CN); ZHANG YUEJIAN (CN); SONG JUN (CN)**Applicant:** CAO WEI (CN); LI WENQUAN (CN); ZHANG YUEJIAN (CN); SONG JUN (CN)**Classification:****- International:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): G01N33/53; C12Q1/68**- european:** C12Q1/68B6; C12Q1/68B10A**Application number:** WO2002CN00591 20020826**Priority number(s):** CN20011026578 20010829**Also published as:** CN1186457C (C)**Cited documents:** CN1248702
 WO0148242**Report a data error here****Abstract of WO03019189**

The invention disclosed a homogeneous phase gene microarray which include: a base plate where are 4-100,000 reaction cavities. There are artificial sequences templet primers group at least one of the reaction cavities. The said primers group include oligonucleotide primer pairs which can be specially linked to need checking sequences and activate the target nucleic acid amplification process, at least one of those primers is artificial sequence templet primer. This artificial sequence templet primer includes: (a) special combination areas, (b) general areas. The invention also provided the method of nucleic acid sequences detection and/or quantitative analysis using this gene microarray. The invention is useful in the detection and/or quantitative analysis of genome mutation and expressing and pathogens of the samples easily, sensitively and exactly.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Family list**3** family members for:**WO03019189**

Derived from 2 applications.

[Back to WO03019189](#)**1 Homogeneous genetic matrix**Publication info: **CN1186457C C** - 2005-01-26**CN1407113 A** - 2003-04-02**2 HOMOGENEOUS PHASE GENE MICROARRAY**Publication info: **WO03019189 A1** - 2003-03-06

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2003年3月6日(06.03.2003)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 03/019189 A1

(51) 国际分类号: G01N 33/53, C12Q 1/68

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00591

(22) 国际申请日: 2002年8月26日(26.08.2002)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
01126578.7 2001年8月29日(29.08.2001) CN

(71)(72) 发明人/申请人: 曹卫(CAO, Wei) [CN/CN];
中国上海市虹梅路3131号22B, Shanghai 201103 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 李文全(LI, Wenquan) [CN/CN]; 中国上海市控江路1029弄3号1505室, Shanghai 200093 (CN)。 张跃健(ZHANG, Yuejian) [CN/CN]; 中国上海市罗秀路955弄67号202室, Shanghai 200237 (CN)。 宋军(SONG, Jun) [CN/CN]; 中国上海市华灵路1351弄43号501室, Shanghai 200442 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: HOMOGENEOUS PHASE GENE MICROARRAY

(54) 发明名称: 均相基因矩阵

(57) Abstract: The invention disclosed a homogeneous phase gene microarray which include: a base plate where are 4-100,000 reaction cavities. There are artificial sequences templet primers group at least one of the reaction cavities. The said primers group include oligonucleotide primer pairs which can be specially linked to need checking sequences and activate the target nucleic acid amplification process, at least one of those primers is artificial sequence templet primer. This artificial sequence templet primer includes: (a) special combination areas, (b) general areas. The invention also provided the method of nucleic acid sequences detection and/or quantitative analysis using this gene microarray. The invention is useful in the detection and/or quantitative analysis of genome mutation and expressing and pathogens of the samples easily, sensitively and exactly.

(57) 摘要

本发明提供了一种均相基因矩阵, 它包括: 一基板, 所述基板上具有 4-100,000 个反应孔; 在至少一个所述的反应孔内具有人工序列模板引物集, 所述引物集包括: 特异性结合于被检测核酸序列并引发目的核酸扩增反应的寡核苷酸引物对, 其中至少一个引物是人工序列模板引物, 该人工序列模板引物包括: (a) 特异结合区; (b) 公用区。本发明还提供了一种使用该基因矩阵来检测和/或定量核酸的方法。本发明易用、灵敏、准确, 可高通量地检测和/或定量样品中的病原体及其变异、基因组的变异(如单核苷酸多态性、基因重组)和基因表达等。

均相基因矩阵

技术领域

本发明涉及核酸检测领域，更具体地，涉及一种高通量核酸检测用的均相基因矩阵，
5 以及使用该基因矩阵来检测和/或定量核酸的方法。

背景技术

近来，为了满足快速准确地检测和/或定量病原体(如病毒、细菌、真菌)，以及正常和
10 不正常基因中的特异性核酸序列，已有开发了大量技术。这些技术在检测和定量食品、环境样品、种畜和其他类型物质中微生物方面有着广阔的用途，在这些场合下需要监测某种推定微生物是否存在。其他应用包括用于法医学、分子病理学、人类学、考古学和生物学等方面。

实现这类任务的一种常见做法是核酸杂交。该方法基于两条核酸链在合适条件下形成
15 双链结构的能力，其中这两条核酸链含有互补或基本互补的序列从而能够特异性地结合。为了检测和/或定量特定的核酸序列(称为“靶序列”)，需制备标记的寡核苷酸(“探针”)，该探针含有与靶序列互补的序列。为了灵敏地检测和/或定量微量的遗传物质，已经开发了许多更成熟的技术，它们通常涉及在测试样品中扩增靶核酸(DNA 或 RNA)并随后进行检测，其中包括聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、链取代扩增(SDA)、转录介导扩增(transcription mediated amplification, TMA)和自动维持合成反应(3SR)。

20 尽管所有这些技术都是检测和鉴别样品中微量靶核酸的有利工具，但是它们有各种不同的问题，这些问题限制了它们在临床实验室环境下用于常规操作时的应用性。最困难的问题之一是，在每种测试中扩增靶核酸以便随后进行检测和定量分析的条件是不同的。换言之，没有利于测试标准化的统一条件。

此外，核酸检测技术已从单一的核酸杂交和 PCR 反应走向多靶同时检测，进而发展到
25 在一小块基片上同时检测成千上万的核酸序列，即基因矩阵技术(microarray)。基因矩阵技术是人类科学史的一场革命，真正实现了核酸的高通量检测，促进了人类基因组和后基因组的研究和开发，在基础研究和生物医学实践中发挥巨大作用。

基因矩阵技术是利用微电子、微机械、化学、物理和计算机技术在固体芯片表面构建
30 的微流体系统和单元，将生命科学研究中所涉及的不连续的分析过程(如样品制备、化学反应和分析检测)连续化、集成化和微型化。基因矩阵技术在药物开发、新基因发现、疾病发生机理、疾病诊断等诸多领域用途广泛。其基本原理依然是核酸杂交。它将大量探针分子固定在支持物上，然后与标记的样品进行杂交，通过检测杂交信号的强度及分布进行分析。

目前，国际流行的基因矩阵技术有原位合成和点样两种方法。

原位合成法主要包括光指导并行合成法(Affymetrix Inc.)、微流体通道法和分子印
35 章法。其中 Affymetrix Inc. 的光指导并行合成法最为成熟，其具体过程如下：水银光有选择性地照射到有光掩蔽剂(M1)保护的玻璃片上，以去掉玻璃片上的光敏基团(X)，从而激活 DNA 的合成过程。在去掉光敏基团的特定部位偶联一个光保护碱基(A-X)。再将第二个光掩蔽剂(M2)置于这个受光保护的碱基上。不断地去保护和偶联就可以得到 30 个碱基长度的寡核苷酸片段。许多这样的不同序列的片段就构成 DNA 方阵。

40 点样法首先按常规方法制备 cDNA(或寡核苷酸)探针库，然后通过特殊的针头或微喷

头, 分别把不同的探针溶液, 逐点分配在玻璃、尼龙或其他固相基片表面的不同位点上, 并通过物理和化学的结合使之固定于相应位点。探针片段来自多种途径, 除了寡核苷酸探针, 也可使用较长的基因片段以及核酸类似物探针(如 PNA)。探针的制备方法可以用常规 DNA 探针合成方法, 或 PCR 扩增的 cDNA、EST 文库等。

5 因此, 基因矩阵技术的过程如下: 寡核苷酸合成或 PCR 制备靶基因, 并点样固定于基片上。同时根据不同用途制备荧光探针, 并与点样固定好的基片杂交, 随后进行检测分析。

然而, 基因矩阵技术发展并不完善, 技术本身以下一些缺陷:

(1) 原位合成法的寡核苷酸合成效率低; 点样法需要成千上万个 PCR 反应扩增用于点样的核酸, 而且需要多次重复验证;

10 (2) 样品的制备和标记操作较为烦琐, 需要提取足够的 mRNA 方可进行有效标记;

(3) 在同一基片上, 无法照顾成千上万样点上因固定的核酸的不同而采取不同的杂交条件;

(4) 成本高, 需要的仪器昂贵, 限制了该技术的普及应用;

15 (5) 虽然根据杂交后信号的强弱判定信号量的大小, 但这样的定量极为粗浅, 不能标准化;

(6) 价格昂贵。

因此, 本领域迫切需要开发易用、灵敏、准确的检测和/或定量样品中病原体和基因表达的基因芯片技术。

20 发明内容

本发明的目的就是提供一种可用于检测和/或定量样品中病原体和基因表达的易用、灵敏、准确的基因矩阵技术。本发明的新技术可以克服现有技术中的许多局限。

在本发明的第一方面, 提供了一种均相基因矩阵, 它包括:

25 一基板, 所述基板上具有 4-100,000 个反应孔;

在至少一个所述的反应孔内具有人工序列模板引物集, 所述引物集包括: 特异性结合于被检测核酸序列并引发目的核酸扩增反应的寡核苷酸引物对, 其中至少一个引物是人工序列模板引物, 该人工序列模板引物包括:

30 (a) 特异结合区, 该特异结合区位于人工序列模板引物 3'端, 用于与被检测核酸序列特异性结合;

(b) 公用区, 该公用区位于人工序列模板引物的 5'端并且具有报告分子结合区和公用引物区, 报告分子可特异性结合于该报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链, 且所述的报告分子在下列两种情况下的状态不同, 从而产生可检测的信号: (i) 结合于报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链, 和 (ii) 报告分子被切断或被取代。

35 在一优选例中, 所述基板上还设为对照区, 所述对照区有至少一个反应孔, 用于放置对照试剂。

在另一优选例中, 所述的基板是 96 孔板和由光纤束, 所述的光纤束由末端有反应池的光纤组成。较佳地, 所述的均相基因矩阵还包括一封闭件, 用于封闭基板的反应孔。

40 在一优选例中, 所述的报告分子包括: 荧光共振能量转移型信号探针、和含稀土元素的寡核苷酸链。更佳地, 所述的荧光共振能量转移型信号探针选自下组: Taqman 探针、FRET 双探针、分子信标和 PNA 信号探针, 且在特异结合区和报告分子结合区之间存在间隔

区, 和/或在公用引物区和报告分子结合区之间存在间隔区, 所述的间隔区为 1-20bp。

在另一优选例中, 所述的人工序列模板引物集, 还包括用于增加被检测核酸模板数量的扩增模板引物。

5 在另一优选例中, 人工序列模板引物还在特异结合区和报告分子结合区之间存在间隔区, 和/或在公用引物区和报告分子结合区之间存在间隔区, 所述的间隔区为 1-20bp, 较佳地为 5-10bp。

在另一优选例中, 所述人工序列模板引物的公用引物区的长度为 0bp。

在本发明的第二发明, 通过了一种检测核酸检测方法, 它包括步骤:

10 (1) 将样品加至一基板, 所述基板上具有 4-100,000 个反应孔; 在至少一个所述的反应孔内具有人工序列模板引物集, 所述引物集包括: 特异性结合于被检测核酸序列并引发目的核酸扩增反应的寡核苷酸引物对, 其中至少一个引物是人工序列模板引物, 该人工序列模板引物包括:

(a) 特异结合区, 该特异结合区位于人工序列模板引物 3'端, 用于与被检测核酸序列特异性结合;

15 (b) 公用区, 该公用区位于人工序列模板引物的 5'端并且具有报告分子结合区和公用引物区, 报告分子可特异性结合于该报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链, 且所述的报告分子在下列两种情况下的状态不同, 从而产生可检测的信号: (i) 结合于报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链, 和(ii) 报告分子被切断或被取代。

(2) 在特异性条件下进行核酸扩增反应,

20 (3) 检测报告分子所产生的可检测信号。

在一优选例中, 使用两种或两种以上不同的人工序列模板引物集, 这些人工序列模板引物集分别特异性地结合于不同被检测体的靶序列、同一被检测体的不同靶序列、同一被检测体的相同靶序列的不同区域、或其组合, 并且这些人工序列模板引物集的报告分子结合区分别与相同或不同的报告分子发生特异性结合。

25

附图说明

图 1 显示了本发明的人工序列模板引物的两种结构示意图。

图 2 显示了本发明人工序列模板引物集的各种组合形式。

图 3 显示了本发明人工序列模板检测中信号产生几种示意图。

30 图 4 是本发明一种核酸检测方法的示意图, 其中使用的人工序列模板引物集含有一个人工序列模板引物, 其报告分子结合与人工序列模板的报告分子结合区。

图 5 是本发明一种核酸检测方法的示意图, 其中使用的人工序列模板引物集含有一个人工序列模板引物、一个常规引物、一个公用引物和一个扩增模板引物, 其报告分子结合与人工序列模板的报告分子结合区。

35 图 6 是本发明均相基因矩阵检测方法的流程图。

具体实施方式

40 本发明的均相基因矩阵技术是人工序列模板核酸检测技术与荧光信号实时检测及微加样技术相结合的产物。简而言之, 均相基因矩阵技术包括以下步骤: 利用相关软件(如 Primer 等), 在核酸靶序列上寻找合适的引物片段, 再设计并合成符合要求的人工序列模板引物集; 将人工序列模板引物集和检测样品加至例如 96 孔板或更高密度基板; 在同一或

基本相同的 PCR 反应条件下进行扩增并检测，从而实现大量核酸靶序列的扩增检测。

本发明的均相基因矩阵技术中最核心的技术是人工序列模板核酸检测技术(详见下文)。至于在均相基因矩阵中采用的其他技术，如微流控技术、微加样技术、光电信号技术、计算机技术和生物信息学技术等均为现有技术。

5

如本文所用，下列词语/术语具有下列含义，除非另外说明。

“核酸”：核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、RNA 或 DNA 的多核苷酸类似物、RNA 或 DNA 的寡核苷酸类似物。

10 “模板”：能够被核酸聚合酶扩增的核酸分子的全长或部分序列。模板可以是 RNA 或 DNA、或其类似物，并且可以是单链、双链或部分双链的。

“人工序列模板(AT)引物”：人工序列模板引物是合成的寡核苷酸序列。参见图 1A，人工序列模板引物的 3'端有特异结合区，该特异结合区互补于靶序列并作为引物在扩增反应中延伸。此外，人工序列模板引物还含有公用区，该公用区位于人工序列模板引物的 5'端并且具有报告分子结合区(或其互补序列)和公用引物区。报告分子可特异性结合于该报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链。人工序列模板引物可以用本领域技术人员已知的各种方法合成。

一种特殊形式的人工序列模板引物的公用引物区的长度为 0bp，如图 1B 所示。

如本文所用，“报告分子结合区”指与人工序列模板引物上报告分子发生结合的区域。当然，报告分子可以直接结合于人工序列模板引物上的该报告分子结合区，也可结合于该结合区的互补链(为方便起见，人工序列模板引物上的与报告分子序列一样的区域仍被称为“报告分子结合区”)。

此外，一种优选的人工序列模板引物还在特异结合区和报告分子结合区之间存在间隔区，和/或在公用引物区和报告分子结合区之间存在间隔区，所述的间隔区为 1-20bp(较佳地为 3-10bp，更佳地为 5-10bp)。添加间隔区的主要目的是：(1)调节人工序列模板引物的 T_m ，使人工序列模板引物集中各引物的 T_m 接近或相同；(2)防止某些二级结构(如发夹结构、二聚体等)的形成；和/或(3)防止空间位阻。然而应理解，并不是所有情况下都需要间隔区，有时并不需要间隔区。取决于待检测的序列，本领域的技术人员能够确定人工序列模板引物是否需要间隔区，以及间隔区的长短和组成。

30 “报告分子”是一种用于产生可检测信号的分子。所述的报告分子在下列两种情况下的状态不同，从而产生可检测的信号：(i)结合于报告分子结合区或其互补序列区域，和(ii)报告分子被切断或被取代。合适的报告分子例子是基于荧光共振能量转移(FRET)原理的探针和含稀土元素的寡核苷酸链。

35 荧光共振能量转移(FRET)：是利用不同荧光物质激发光波长、发射光波长间的相互作用，对某些特定波长光进行检测的一种信号检测原理。基于此原理产生信号的探针被称为荧光共振能量转移型探针。特别合适的荧光共振能量转移型探针包括(但并不限于)：Taqman 探针、分子信标(molecular beacon)(图 3D)、FRET 双探针(图 2J)和肽核酸(peptide nucleic acid)信号探针(简称为 PNA 信号探针)。

40 “Taqman 探针”是一种在其 5'端带有报告基团并且在 3'端带有猝灭基团的寡核苷酸，所述的猝灭基团会抑制报告基团产生可检测的信号(例如荧光)。Taqman 探针设计是现有技术，并且可以从公开途径获得有关信息(Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM; Real Time Quantitative PCR, *Genome Res.* 1996 Oct.; 6(10):986-94)。

图 3 显示了本发明人工序列模板检测中信号产生几种示意图。图 3A 和图 3B 为 Taqman 探针因切割而产生可检测信号，图 3C 为 FRET 双探针因酶切或取代而产生可检测信号。图 3D 为分子信标因杂交而产生可检测信号。

“人工序列模板”指在本发明的 PCR 过程中，扩增产生的、掺入了人工序列模板引物的核酸序列或其反义核酸序列。这些人工序列模板既具有对应于靶序列的核苷酸序列，又具有对应于人工序列模板引物公用区（包括报告分子结合区、公用引物区和间隔区）的核苷酸序列。在随后的 PCR 扩增循环中，这些人工序列模板作为模板起作用。

本发明所公开的方法原则上归为信号扩增法。其关键是使用了合适的含人工序列的核酸序列作为信号扩增的模板（在此称为“人工序列模板”），因此相应的方法被称为“人工序列模板扩增的核酸分析”。该方法可灵敏、准确和标准化地检测和/或定量靶核酸分子。

在本发明中，对于待测样品没有限制，只要待测物为核酸分子即可。代表性的待测样品包括（但并不限于）：DNA 样品、RNA 样品、和从 RNA 经逆转录得到的 cDNA 样品，以及其他形式的修饰过的多聚核苷酸。

在本发明的人工序列模板引物中，对所述的特异结合区的长度没有特别限制，通常其长度为 6-35bp，较佳地为 15-25bp。对于所述公用区的也没有特别限制，通常其长度为 8-100bp，较佳地为 20-60bp，更佳地约为 30-50bp。

人工序列模板引物中含有的核苷酸通常选自 A、T、C、G。然而，在所述的人工序列模板引物中含有其他一些核苷酸以产生特殊的检测效果，如增加特异性、掺入荧光分子、或增加与模板的结合等。合适的例子但不限于选自下组的核苷酸：isoG、isoC、2'-O-甲基-G、2'-O-甲基-C、抗原分子或生物素标记的核苷酸、及其组合。

在本发明的反应体系中，报告分子与人工序列模板引物的数量关系没有特别限制。然而，较佳地，所述报告分子的数量应大于或等于人工序列模板引物的数量，通常报告分子与人工序列模板引物之比大于 1：1-10：1，更佳地为 1.5:1-5:1。这样，在反应体系中，人工序列模板引物便基本上都处于与报告分子结合的状态。

当报告分子是 Taqman 探针时，Taqman 探针与人工序列模板引物报告分子结合区的 T_m ，宜高于人工序列模板引物特异结合区与模板的 T_m 。通常高出 2-15℃，较佳地高出 5-12℃。

此外，在本发明的人工序列模板引物集中还可包括一个或多个“扩增模板引物”。如本文所用，“扩增模板引物”指用于增加被检测核酸序列（模板）数量的引物。扩增模板引物结合于待检测序列的上游或下游，在扩增反应中可有效地提高模板的数量，从而提供检测的灵敏度。应理解，“扩增模板引物”是常规引物，只是其作用是提高待检测模板的数量而已。

在本发明中，如图 2 所示，人工序列模板引物集有多种组合形式，其中包括（但并不限于）：

(1) 下游为人工序列模板引物，上游为常规引物，报告分子与人工序列模板引物结合（图 2A），或上下游引物位置互换（图 2B）；

(2) 图 2A 的引物集与一条扩增模板引物形成的组合（图 2C），图 2B 的引物集与一条扩增模板引物形成的组合（图 2D）。即上下游为常规引物对，中间为一条人工序列模板引物，报告分子与人工序列模板引物结合。

(3) 两条人工序列模板引物与两条扩增模板引物构成的组合（图 2E）。即上下游为常规引物对，中间为一对方向相对的人工序列模板引物，报告分子与人工序列模板引物结合；

(4) 上下游为常规引物对, 中间两条人工序列模板引物方向相反, 报告分子与人工序列模板引物结合(图 2F);

(5) 下游为人工序列模板引物, 上游为常规引物, 报告分子与人工序列模板引物的互补序列结合(图 2G), 或上下游引物位置互换(未示出);

5 (6) 图 2G 的引物集与一条扩增模板引物形成的组合(图 2H), 即上下游为常规引物对, 中间为一条人工序列模板引物, 报告分子与人工序列模板引物互补序列结合, 或人工序列模板引物方向变换;

10 (7) 上游为常规引物, 下游为人工序列模板引物, 报告分子分别标记在人工序列模板引物及报告分子上(图 2I), 或人工序列模板引物方向变换(未示出); 或者图 2I 的引物集与一条扩增模板引物形成的组合(图 2J);

(8) 图 2E+图 2G 的组合, 即上下游为常规引物对, 中间为一对反向相对的人工序列模板引物, 报告分子与人工序列模板引物互补序列结合(未示出)

(9) 图 2F+图 2G 的组合, 即上下游为常规引物对, 中间两条人工序列模板引物方向相反, 报告分子与人工序列模板引物互补序列结合(未示出);

15 (10) 图 2E+图 2I 的组合, 即上下游为常规引物对, 中间为一对相反相对的人工序列模板引物, 报告分子分别标记在人工序列模板引物及报告分子上(未示出);

(11) 图 2F+图 2I 的组合, 即上下游为常规引物对, 中间为两条方向相反的人工序列模板引物, 报告分子分别标记在人工序列模板引物及报告分子上(未示出)。

20 在本发明方法中, 在同一被检测核酸序列上可同时放置一个或多个个人工序列模板引物集。这样可以同时检测被检测核酸序列上的不同位置, 或同一位置上的 SNP。

在本发明中, 对于与人工序列模板引物结合的报告分子而言, 不同的人工序列模板引物可结合相同的报告分子, 也可结合不同的报告分子(例如带有发不同荧光的报告基团和相应猝灭基团的报告分子, 序列相同或不同的报告分子)。

25 对于人工序列模板引物集扩增出的人工序列模板的长度没有特别限制。按人工序列模板引物集的两个引物的特异结合区的 3'端在模板上相距的距离表示, 通常为 1bp-10kb, 较佳地为 1-2kb, 更佳地为 1-500b, 最佳地为 1-100bp。尤其是当间距小于 100bp 时, 可设计针对例如病原体高保守区的引物集, 从而降低假阴性率。此外, 间距越短, 越可发挥人工序列模板的共性。

30 下面结合附图进一步说明本发明。

扩增模式(一)、使用含人工序列模板引物和常规引物的引物集(图 2A 所示的组合)进行核酸扩增分析

35 现参见图 4。在该例子中, 使用一个人工序列模板引物集, 该引物集包括一个人工序列模板引物 1 和一个常规引物 2。此外, 反应体系中还包括公用引物 3 和报告分子 4 构成。在该例子中, 待检测的样品是 RNA 或 DNA。

步骤 1: 将引物集和待测样品置于反应体系中。

步骤 2: 在合适的条件下, 发生退火(或杂交), 即人工序列模板引物 1 的 3'端的特异结合区结合于靶 RNA 或 DNA 序列。

40 步骤 3: 在逆向转录酶(对于 RNA 靶序列)或 DNA 聚合酶(对于 DNA 靶序列), 人工序列模板引物的 3'端向靶序列 5'端延伸, 形成 RNA/DNA 或 DNA/DNA 双链。

步骤 4: 形成的双链核酸在合适的条件下变性, 形成单链靶序列和新合成的 DNA 序列(即

人工序列模板)。或者用 RNase 水解 RNA 链, 形成新合成的 DNA 序列(即人工序列模板)。

必要时, 在合适的条件下重复上述步骤 3-4。

步骤 5: 常规引物 2 结合于新合成的 DNA 序列的互补区域。

5 步骤 6: 在 DNA 聚合酶存在下, 常规引物 2 的 3'端向人工序列模板序列 5'端延伸, 双链 DNA(该双链中新合成的 DNA 序列也是人工序列模板)。当常规引物 2 的 3'端延伸到结合于报告分子结合区的报告分子处时, 会发生以下 3 种情况:

(1) 延伸停止;

(2) 继续延伸, 将报告分子从人工序列模板上取代下来;

(3) 继续延伸, 并切断或破坏报告分子。

10 在第一和第二种情况下, 报告分子仍是完整的, 因此不会产生可检测信号。而在第三种情况下, 由于报告分子(如 Taqman 探针)5'端上的猝灭基团被 DNA 聚合酶(如 Taq 聚合酶)的 5'核酸酶活性所水解, 因此在 Taqman 探针 3'端处的报告基团就不再被猝灭, 从而导致产生可检测信号(如荧光信号)。

步骤 7: 在下一循环中, 在变性后的退火时, 会发生三种情况:

15 7a: 人工序列模板引物 1 结合于含常规引物 2 序列的新合成的 DNA 序列。

7b: 公用引物 3 结合于含常规引物 2 序列的新合成的 DNA 序列。

7c: 常规引物 2 结合含人工序列引物 1 序列的人工序列模板(类似于步骤 5, 未示出)。

步骤 8: 分三种情况:

8a: 人工序列模板引物 1 向含常规引物 2 序列的 DNA 链的 5'端延伸, 形成 DNA 双链。

20 在下一轮循环中, 这些 DNA 双链就是新的人工序列模板。

8b: 公用引物 3 向含常规引物 2 序列的 DNA 链的 5'端延伸, 形成 DNA 双链。在下一轮循环中, 这些 DNA 双链就是新的人工序列模板。

8c: 与步骤 6 中相同, 当常规引物 2 的 3'端延伸到结合于报告分子结合区的报告分子处时, 会发生以下 3 种情况:

25 (1) 延伸停止;

(2) 继续延伸, 将报告分子从人工序列模板上取代下来;

(3) 继续延伸, 并切断或破坏报告分子。

在第一和第二种情况下, 报告分子仍是完整的, 因此不会产生可检测信号。而在第三种情况下, 由于报告分子(如 Taqman 探针)5'端上的猝灭基团被 DNA 聚合酶(如 Taq 聚合酶)的 5'核酸酶活性所水解, 因此在 Taqman 探针 3'端处的报告基团就不再被猝灭, 从而导致产生可检测信号(如荧光信号)。

步骤 9: 重复步骤 7 和 8。

在经过若干循环后, 与 PCR 原理相同, 因报告分子被切断而产生的可检测信号也是成指数级(或近似于指数关系)增加的。在可检测信号是荧光的情况下, 这些信号可用实时荧光阅读仪, 如 Roche's LightCycler, 或者 ABI GeneAmp 5700 或 GeneAmp 7700 等进行实时测定; 也可使用静态荧光阅读仪, 在核酸扩增反应结束后进行荧光测定。

扩增模式(二)、使用图 2C 所示的人工序列模板引物集进行核酸扩增分析

40 现参见图 5。在该例子中, 使用一条人工序列模板引物 1, 常规引物 2 和扩增模板引物 5 组成一个引物集。反应体系中还包括公用引物 3 及报告分子 4。在该例子中, 待检测的样品是 DNA 或 RNA。

步骤 1：将引物集和待测样品置于反应体系中。

步骤 2：在合适的条件下，发生退火(或杂交)，此时发生两种情况：

2a：人工序列模板引物 1 的 3'端的特异结合区结合于靶 RNA 或 DNA 序列。

2b：扩增模板引物 5 与靶 RNA 或 DNA 序列结合。

5 步骤 3：

3a：对应于上述第一种情况，在逆向转录酶(对于 RNA 靶序列)或 DNA 聚合酶(对于 DNA 靶序列)作用下，人工序列模板引物 1 的 3'端向靶序列 5'端延伸，形成 RNA/DNA 或 DNA/DNA 双链。

10 3b：对应于上述第二种情况，在逆向转录酶(对于 RNA 靶序列)或 DNA 聚合酶(对于 DNA 靶序列)作用下，扩增模板引物 5 的 3'端向靶序列 5'端延伸，形成 RNA/DNA 或 DNA/DNA 双链。

步骤 4：形成的双链核酸在合适的条件下变性，形成单链靶序列和新合成的 DNA 序列(即人工序列模板)。或者用 RNase 水解 RNA 链，形成新合成的 DNA 序列(在第一种情况下，形成人工序列模板；在第二种情况下，提供与常规引物 2 结合的靶分子核酸序列)。

必要时，在合适的条件下重复步骤 2，3 和 4(任选的)。

15 步骤 5：在下一循环中，在变性后的退火时，会发生四种情况：

5a：常规引物 2 结合于新合成的含人工序列模板引物 1 的 DNA 链。

5b：常规引物 2 结合于新合成的含扩增模板引物 5 的 DNA 链。

5c：人工序列模板引物 1 的 3'端的特异结合区结合于靶 RNA 或 DNA 序列(同步骤 2a，未示出)。

20 5d：扩增模板引物 5 与靶 RNA 或 DNA 序列结合(同步骤 2b，未示出)。

步骤 6：

6a：对应于 5a，在 DNA 聚合酶存在下，常规引物 2 的 3'端向人工序列模板序列 5'端延伸，双链 DNA(该双链中新合成的 DNA 序列也是人工序列模板)。当人工序列模板引物 2 的 3'端延伸到结合于报告分子结合区的报告分子处时，会发生以下 3 种情况：

25 (1)延伸停止；

(2)继续延伸，将报告分子从人工序列模板上取代下来；

(3)继续延伸，并切断或破坏报告分子。

在第一和第二种情况下，报告分子仍是完整的，因此不会产生可检测信号。而在第三种情况下，由于报告分子(如 Taqman 探针)5'端上的猝灭基团被 DNA 聚合酶(如 Taq 聚合酶)的 5'核酸酶活性所水解，因此在 Taqman 探针 3'端处的报告基团就不再被猝灭，从而导致产生可检测信号(如荧光信号)。

6b：对应于 5b，在 DNA 聚合酶存在下，常规引物 2 的 3'端向含扩增模板引物 5 序列的新生链 5'端延伸，形成 DNA 双链。在下一轮循环中，这些 DNA 双链就是新的人工序列模板。

6c 和 6d：对应于 5c 和 5d，分别形成新的人工序列模板(同步骤 3a 和 3b 未示出)。

35 步骤 7：在下一循环中，在变性后的退火时，会发生四种情况：

7a：常规引物 2 结合于新合成的含人工序列模板引物 1 的 DNA 链(同 5a，未示出)。

7b：常规引物 2 结合于新合成的含扩增模板引物 5 的 DNA 链(同 5b，未示出)。

7c：人工序列模板引物 1 的 3'端的特异结合区结合于靶 RNA 或 DNA 序列(类似于同步骤 2a)。

40 7d：扩增模板引物 5 与靶 RNA 或 DNA 序列结合(同步骤 2b，未示出)；

7e：公用引物 3 结合于含常规引物 2 序列的新合成的 DNA 序列。

步骤 8：在下一延伸过程中，可能会发生以下几种情况：

8a：在 DNA 聚合酶存在下，常规引物 2 的 3'端向人工序列模板序列 5'端延伸，形成双链 DNA(该双链中新合成的 DNA 序列也是人工序列模板)。当人工序列模板引物 2 的 3'端延伸到结合于报告分子结合区的报告分子处时，会发生以下 3 种情况：

- 5 (1) 延伸停止；
(2) 继续延伸，将报告分子从人工序列模板上取代下来；
(3) 继续延伸，并切断或破坏报告分子。

在第一和第二种情况下，报告分子仍是完整的，因此不会产生可检测信号。而在第三种情况下，由于报告分子(如 Taqman 探针)5'端上的猝灭基团被 DNA 聚合酶(如 Taq 聚合酶)的 5'核酸酶活性所水解，因此在 Taqman 探针 3'端处的报告基团就不再被猝灭，从而导致产生可检测信号(如荧光信号)。

8b：同 6b，在 DNA 聚合酶存在下，常规引物 2 的 3'端向含扩增模板引物 5 序列的新生链 5'端延伸，形成 DNA 双链。在下一轮循环中，这些 DNA 双链就是新的人工序列模板。

8c：同 6c，形成新的人工序列模板(类似于步骤 3a)。

15 8d：同 6d，形成新的人工序列模板(类似于 3b)。

8e：公用引物 3 向含常规引物 2 序列的 DNA 链的 5'端延伸，形成 DNA 双链。在下一轮循环中，这些 DNA 双链就是新的人工序列模板。

步骤 9：重复步骤 7 和 8。

在经过若干循环后，与 PCR 原理相同，因报告分子被切断而产生的可检测信号也是成指数级(或近似于指数关系)增加的。在可检测信号是荧光的情况下，这些信号可用实时荧光阅读仪，如 Roche's LightCycler，或者 ABI GeneAmp 5700 或 GeneAmp 7700 等进行实时测定；也可使用静态荧光阅读仪，在核酸扩增反应结束后进行荧光测定。

在本发明方法中，报告分子也可与人工序列模板上报告分子结合区的互补链结合(图 2G 和图 2H)，或者使用两个人工序列模板及两个常规引物(图 2E 和 2F 的组合)，其核酸扩增过程与扩增模式(一)和(二)基本相同，

在本发明中，另一种产生信号的方式是使用 FRET 双探针，即报告信号基团分别标记在人工序列模板及报告分子上。参见图 3C 和 3C'。此时，人工序列模板引物集包括：一个标记有 FRET 基团如 FAM 荧光素的人工序列模板引物 1，和一对常规引物 2。在反应体系中，还包括用另一 FRET 基团如标记 Dabcyl 的报告分子 4(寡核苷酸)。

30 步骤 1-5，与扩增模式(一)步骤 1-5 类似。

在步骤 6 中：在第一种情况下，在 DNA 聚合酶存在下，常规引物 2 的 3'端向人工序列模板序列 5'端延伸，形成双链 DNA(该双链中新合成的 DNA 序列也是人工序列模板)。当人工序列模板引物 2 的 3'端延伸到结合于报告分子结合区的报告分子处时，会发生以下 3 种情况：

- 35 (1) 延伸停止；
(2) 继续延伸，将报告分子从人工序列模板上取代下来；
(3) 继续延伸，并切断或破坏报告分子。

在第一情况下，报告分子结合在人工序列模板引物，与其上标记的 Dabcyl 猝灭人工序列模板引物上的 FAM 分子，因此不会产生可检测信号。在第二种情况下，虽然报告分子是完整的，但由于新生链取代了报告分子，使报告分子与人工序列模板引物间的相互猝灭被破坏，从而产生可检测信号(见图 3C')。在第三种情况下，报告分子的猝灭基团被 DNA 聚

合酶(如 Taq 聚合酶)的 5'核酸酶活性所水解, 因此人工序列模板引物上的报告分子如 FAM 就不再被猝灭, 从而导致产生可检测信号(如荧光信号)(图 3C)。

在第二种情况下, 在 DNA 聚合酶存在下, 常规引物 2 的 3'端向含扩增模板引物 5 序列的新生链 5'端延伸, 形成人工序列模板。

5 步骤 7-9 与上述扩增模式(一)中步骤 7-9 类似。

在经过若干循环后, 与 PCR 原理相同, 因报告分子被切断或取代而产生的可检测信号也是成指数级(或近似于指数关系)增加的。在可检测信号是荧光的情况下, 这些信号可用实时荧光阅读仪, 如 Roche's LightCycler, 或者 ABI GeneAmp 5700 或 GeneAmp 7700 等进行实时测定; 也可使用静态荧光阅读仪, 在核酸扩增反应结束后进行荧光测定。

10 本发明的人工序列模板核酸检测技术具有明显优于现有技术的优点, 其主要优点包括:

(1) 易于复合式检测

15 掺入该人工序列模板区可在新合成的 DNA 序列中引入不属于靶序列的一段序列。而新合成的 DNA 序列可作为进一步 DNA 扩增的模板。与不同靶序列的数目无关, 新合成的 DNA 序列是大部分是相同的-人工序列模板区序列, 这使得各不同的靶序列被转变成具有共同特性的序列。因此, 可以在相同或基本相同的条件下对该 DNA 序列继续处理或操作, 易于实现例如多管同一条件、或一管多种靶序列等复合式检测。

(2) 更高的分析灵敏度

20 通过使用含两个人工序列模板引物的引物集, 或者对单个靶序列的不同位点设计多个人工序列模板引物集, 可以产生现有技术中单探针模式更高水平的信噪比。

此外, 使用扩增模板引物还可进一步提高检测灵敏度。

(3) 高准确性

25 本发明的人工序列模板引物和人工序列模板核酸检测方法, 可减少由下列因素导致的假阴性概率:

(a) 在靶序列的探针(或引物)结合位点处的二级结构, 这些二级结构可能会有效地影响探针(或引物)的结合;

30 (b) 在靶序列的探针(或引物)结合位点处序列的改变, 这些变化可以是由于不同的亚型或突变引起的。例如在 HCV 中, 由于使用了各种药物, 会导致 HCV 发生突变或变异。如用常规核酸检测方法, 常会导致假阴性。而在各种生物(包括病原体)的遗传物质中找出高保守的短区域(如 100bp 或更短)是很方便的。利用本发明, 可以设计针对这些短的、高保守区域(如 40-50bp)的人工序列模板引物集, 从而减少假阴性。根据, 本发明人用多对人工序列模板引物集 HCV 突变株的检测, 发现假阴性率减少 50%。

35 (c) 在样品加工或处理过程中长片段靶序列的断裂, 而这种断裂发生在长片段的扩增的中间区域, 会导致互补 DNA 序列复制的停止。

(4) 简化或消除多重检测

在需要检测多种病原体时, 目前常需要对某种病原体进行单独的检测。这是因为不同检测反应的最佳反应条件各不相同, 因此, 在同一反应管中进行核酸扩增反应时, 各扩增反应的效率难以接近一致, 从而难以在同一反应管内同时检测多种病原体。

40 使用本发明的技术, 因为人工序列模板的大部分是相同的, 即人工序列模板区, 因此便于在使检测各病原体的 PCR 的反应条件标准化, 从而在一管中实现对多种病原体的检

测。这使得本发明技术特别适用于献血样品检验等场合。

(5)降低使用荧光标记技术的多倍分析成本

在现有技术中,对于多个待测的靶核酸序列需要相同数目的荧光标记探针。与此相反,在本发明中对于检测多个靶序列可仅使用一种公用报告探针,因此可大大降低成本。

5 在本发明中,对于基板没有特别限制。只要该基板上若有若干个反应孔(即反应池)即可。孔的数目通常为4-100,000个,较佳地为9-10000个,更佳地为16-5000个。反应孔的形状和位置没有特别限制,可为柱状、孔状或齿轮状,或凹或凸,可固定,也可移动。反应池的大小通常为直径10-8000微米,较佳地为20-1000微米,更佳地约200微米;其体积为1nl-100ul,较佳地为100nl-50ul,更佳地为500nl-1ul。

10 反应池对环境温度变化敏感,热传导好,完全可以进行PCR反应。其加热和冷却介质可以是金属、空气、水和光等各种介质。

基板可以由玻璃、聚合物或陶瓷制成。常见的基板是32、36、72、96、384孔格式的多孔板,它通常是用聚丙烯等聚合物材料制成。

15 一种特殊的基板是由光纤制成的集合体。将许多根光纤集成成一光纤集合体(光纤束),利用化学腐蚀的方法,使每根光纤的一端形成一个反应池。这样,光纤集合体就构成了一个含多个反应池的矩阵。光纤的直径可变,其通常大小为0.1-50毫米,较佳地为1-10毫米。每个光纤束内的光纤通常为4-100,000,较佳地为9-10000,更佳地为16-5000。由于光纤有良好的光导功能,因此反应池内产生的发光变化很容易被采集并分析,简化了均相基因矩阵的检测。

20 基板应具有与反应孔相匹配的封盖,如薄膜、耐热封盖,聚合物制成的透明封盖、或石蜡、或不易挥发、耐热且比重小于水的有机溶剂。一种优选的封盖是一体化的封盖,如聚丙烯制成的透明封盖。此外,还可在加入了反应试剂后,将一种或多种可聚合单体直接在加至反应试剂上方,通过聚合而在直接形成一次性的封盖。

25 在本发明的一个优选例中,反应孔的底部或封盖是透明的,这样便可以在PCR反应过程中实现实时检测。

在本发明的均相基因矩阵中,有一种简化的信号采集方法。在该方法中,将光纤与封盖整合设计,使光纤直接插入反应池,使反应产生的荧光直接由光纤传导进入信号采集系统。可以按需求制作多种规格的传导光封盖,在使用时按需要插入仪器,可以满足不同通量检测的需要。

30 在实际操作时,将样品和相应的引物集加至基板上的各反应孔。一种较佳的方式是预先将各种引物集加至各反应孔,然后再加入反应样品。然后,加上封盖,进行PCR反应,并用例如PE5700型、PE7700型荧光PCR仪等仪器进行实时信号采集和信息处理(图6)。或者,在反应结束之后,使用静态荧光读数仪或荧光扫描仪进行数据采集与处理。

35 本发明的均相基因矩阵技术是传统基因矩阵意义上的创新,其设计和制作均优于传统基因矩阵。其功能完全可以取代传统基因矩阵,而且检测快速、灵敏、特异,成本较低,在一些领域如疾病诊断、SNP检测、基因表达分析等方面大有取代传统基因矩阵的可能。具体而言,其主要优点在于:

1. 使用难度和成本低。主要表现为:

40 (1) 实验周期很短,只需数十分钟;

(2) 试剂消耗极低;

(3) 节省大量人力物力;

(4) 节省空间和 PCR 仪。

2. 均相反应：反应速度指数升高。

3. 可采用实时荧光检测技术，灵敏度高。

4. 定量检测容易：三维空间定量范围宽。

5 5. 检测背景低：无论使用多少报告分子用于 mRNA 或 DNA 扩增，均不会有自发或背景荧光信号产生。因为报告分子中的报告基团被淬灭基团抑制。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

10

实施例 1

人工序列模板引物核酸扩增检测 HCV 病毒(RNA 病毒)

在该实施例中，设计了包括一个人工序列模板引物和一个常规引物的人工序列模板引物集，反应过程部分如图 4 所示。

15 在 PCR 方案是：从 RNA 逆转录成 DNA：RT(50 °C，20 分钟，95 °C，5 分钟)；PCR：50 °C，2 分钟，94 °C 5 分钟；94 °C 20 秒；和 61 °C 40 秒，共 40 个循环。

人工序列模板引物为：

5-AAGGAACAGG CGGCGACGAA TCAACGACAG AACGCAACCC AACGCTACTC-3' (SEQ ID NO: 1)

常规引物：

20 5'-GTGCCCCCGC AAGACT-3' (SEQ ID NO: 2)

使用的 Taqman 探针序列是：

5'-TCGTCGCCGC CTGTCCTTA-3' (SEQ ID NO: 3)

25 其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein，6-FAM)(位于 5' 端的)，淬灭基团是 6-羧基-四甲基罗丹明(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine, TAMRA)(位于 3' 端的)。

检测时使用的检测仪器为 ABI GeneAmp 5700，激发光源为卤素灯，波长为 488nm。

用上述引物及相应的 Taqman 探针在 ABI5700 基因扩增仪进行扩增。结果，加入不同稀释度阳性样品在不同循环(Ct)出现荧光信号，而阴性样品及其他非特异对照样品(含有其他病原体的样品)在扩增反应结束时(Ct>40)时均未出现荧光信号。

30

实施例 2

人工序列模板扩增检测 HBV 病毒(DNA 病毒)

在该实施例中，设计了包括一个人工序列模板引物和一个常规引物的人工序列模板引物集，反应过程部分如图 4 所示。

35 在 PCR 方案是：PCR：50 °C，2 分钟，94 °C 5 分钟；94 °C 20 秒；和 61 °C 40 秒，共 40 个循环。

人工序列模板引物分别为：

5-AAGGAACAGG CGGCGACGAA TCAACGACAG AACCAGCGAT AGCCA GGACA-3' (SEQ ID NO: 4)

常规引物：

40 5'-CCTCCAATCA CTCACCAACC-3' (SEQ ID NO: 5)

使用的 Taqman 探针序列是：

5'-TCGTCGCCGC CTGTTCTTA-3' (SEQ ID NO: 3)

其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素 (6-FAM) (位于 5' 端的), 猝灭基团是 6-羧基-四甲基罗丹明 (TAMRA) (位于 3' 端的)。

检测时使用的检测仪器为 ABI GeneAmp 5700, 激发光源为卤素灯, 波长为 488nm。

- 5 用上述引物及相应的 Taqman 探针在 ABI5700 基因扩增仪进行扩增。结果, 加入不同稀释度阳性样品在不同循环 (Ct) 出现荧光信号, 而阴性样品及其他非特异对照样品 (含有其他病原体的样品) 在扩增反应结束时 (Ct>40) 时均未出现荧光信号。

实施例 3

10 人工序列模板扩增检测 HCV 病毒 (RNA 病毒)

在该实施例中, 设计了包括一个人工序列模板引物、一个常规引物和一个公用引物的人工序列模板引物集, 反应过程如图 4 所示。

在 PCR 方案是: 从 RNA 逆转录成 DNA: RT (50 °C, 20 分钟, 95 °C, 5 分钟); PCR: 50 °C, 2 分钟, 94 °C 5 分钟; 94 °C 20 秒; 和 61 °C 40 秒, 共 40 个循环。

15 人工序列模板引物为:

5- TCATCCACAT CCCACCTCAT CAGGAACAGG CGGCGACGAA TCAACGACAG AACGCAACCC AACGCTACTC-3' (SEQ ID NO: 6)

常规引物:

5'-GTGCCCCCGC AAGACT-3' (SEQ ID NO: 2)

20 使用的公用引物序列是:

5'- TCATCCACAT CCCACCTCAT-3' (SEQ ID NO: 7)

使用的 Taqman 探针序列是:

5'-TCGTCGCCGC CTGTTCTTA-3' (SEQ ID NO: 3)

- 25 其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素 (6-FAM) (位于 5' 端的), 猝灭基团是 6-羧基-四甲基罗丹明 (TAMRA) (位于 3' 端的)。

检测时使用的检测仪器为 ABI GeneAmp 5700, 激发光源为卤素灯, 波长为 488nm。

用上述引物及相应的 Taqman 探针在 ABI5700 基因扩增仪进行扩增。结果, 加入不同稀释度阳性样品在不同循环 (Ct) 出现荧光信号, 而阴性样品及其他非特异对照样品 (含有其他病原体的样品) 在扩增反应结束时 (Ct>40) 时均未出现荧光信号。

30

实施例 4

人工序列模板扩增检测 HCV 病毒 (RNA 病毒)

在该实施例中, 设计了包括一个人工序列模板引物、一对常规引物和一个公用引物的人工序列模板引物集, 反应过程如图 5 所示。

- 35 在 PCR 方案是: 从 RNA 逆转录成 DNA: RT (50 °C, 20 分钟, 95 °C, 5 分钟); PCR: 50 °C, 2 分钟, 94 °C 5 分钟; 94 °C 20 秒; 和 61 °C 40 秒, 共 40 个循环。

人工序列模板引物为:

5- TCATCCACAT CCCACCTCAT CAGGAACAGG CGGCGACGAA TCAACGACAG AACGCAACCC AACGCTACTC-3' (SEQ ID NO: 6)

40 常规引物 1:

5'-GTGCCCCCGC AAGACT-3' (SEQ ID NO: 2)

常规引物 2 :

5' - TGAGTGTCGTACAGC CTCCAGG-3' (SEQ ID NO:8)

使用的公用引物序列是:

5' - TCATCCACAT CCCACCTCAT-3' (SEQ ID NO:7)

5 使用的 Taqman 探针序列是:

5' -TCGTCGCCGC CTGTTCTTA-3' (SEQ ID NO: 3)

其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素 (6-FAM) (位于 5' 端的), 猝灭基团是 6-羧基-四甲基罗丹明 (TAMRA) (位于 3' 端的)。

检测时使用的检测仪器为 ABI GeneAmp 5700, 激发光源为卤素灯, 波长为 488nm。

10 用上述引物及相应的 Taqman 探针在 ABI5700 基因扩增仪进行扩增。结果, 加入不同稀释度阳性样品在不同循环(Ct)出现荧光信号, 而阴性样品及其他非特异对照样品(含有其他病原体的样品)在扩增反应结束时(Ct>40)时均未出现荧光信号。

实施例 5

15 人工序列模板扩增检测 HCV 病毒(RNA 病毒)和 HBV 病毒(DNA 病毒)

在该实施例中, 设计了包括两个人工序列模板引物、两对常规引物和一个公用引物的人工序列模板引物集, 反应过程如图 5 所示。

在 PCR 方案是: 从 RNA 逆转录成 DNA: RT(50 °C, 20 分钟, 95 °C, 5 分钟); PCR: 50 °C, 2 分钟, 94 °C 5 分钟; 94 °C 20 秒; 和 61 °C 40 秒, 共 40 个循环。

20 HCV 病毒人工序列模板引物为:

5- TCATCCACAT CCCACCTCAT CAGGAACAGG CGGCGACGAA TCAACGACAG AACGCAACCC
AACGCTACTC-3' (SEQ ID NO: 6)

HBV 病毒人工序列模板引物为:

5'-TCATCCACAT CCCACCTCAT CAGGAACAGG CGGCGACGAA TCATCCAGTC TATGTTTCCC
25 TCTTGTTGCT-3' (SEQ ID NO:9)

HCV 病毒常规引物 1 :

5' -GTGCCCCCGC AAGACT-3' (SEQ ID NO: 2)

HCV 病毒常规引物 2 :

5' - TGAGTGTCGTACAGC CTCCAGG-3' (SEQ ID NO:8)

30 HBV 病毒常规引物 1 :

5' -CCTCCAATCA CTCACCAACC-3' (SEQ ID NO: 5)

HBV 病毒常规引物 2 :

5' -AGTTTCCGTC CGAAGGTTT-3' (SEQ ID NO:10)

使用的公用引物序列是:

35 5' - TCATCCACAT CCCACCTCAT-3' (SEQ ID NO:7)

使用的 Taqman 探针序列是:

5' -TCGTCGCCGC CTGTTCTTA-3' (SEQ ID NO: 3)

其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素 (6-FAM) (位于 5' 端的), 猝灭基团是 6-羧基-四甲基罗丹明 (TAMRA) (位于 3' 端的)。

40 检测时使用的检测仪器为 ABI GeneAmp 5700, 激发光源为卤素灯, 波长为 488nm。

用上述引物及相应的 Taqman 探针在 ABI5700 基因扩增仪进行扩增。结果, 加入不同稀

释度 HCV 和(或)HBV 阳性样品在不同循环(Ct)出现荧光信号,同时含有 HBV 和 HCV 阳性样品不影响检测灵敏度,其 Ct 值主要由高浓度病毒决定。而阴性样品及其他非特异对照样品(含有其他病原体的样品)在扩增反应结束时(Ct>40)时均未出现荧光信号。

5 实施例 6

人工序列模板扩增检测 HCV 病毒(RNA 病毒)

在该实施例中,设计了一个荧光素标记的人工序列模板引物和一对常规引物的人工序列模板引物集,反应过程部分如图 8 所示。

在 PCR 方案是:从 RNA 逆转录成 DNA: RT(50 °C, 20 分钟, 95 °C, 5 分钟); PCR: 10 50 °C, 2 分钟, 94 °C 5 分钟; 94 °C 20 秒; 和 61 °C 40 秒, 共 40 个循环。

人工序列模板引物序列为:

5'-AAGGAACAGG CGGCGACGAA TCAACGACAG AACGCAACCC AACGCTACTC-3' (SEQ ID NO: 11)

其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素(6-FAM)(位于 5' 端的)

常规引物:

15 5'-GTGCCCCCGC AAGACT-3' (SEQ ID NO: 2)

扩增模板引物:

5'-TGAGTGTCGTACAGC CTCCAGG-3' (SEQ ID NO:8)

使用的报告探针序列是:

5'-TCGTCGCCGC CTGTCCTTA-3' (SEQ ID NO: 3)

20 其中使用的猝灭基团是 Dabcyl(即四(4-甲基氨基苯基偶氮)-苯甲酸)(位于 3' 端的)。

检测时使用的检测仪器为 ABI GeneAmp 5700, 激发光源为卤素灯, 波长为 488nm。

用上述引物及相应的 Taqman 探针在 ABI5700 基因扩增仪进行扩增。结果,如果仅使用常规引物 1 和人工序列模板引物进行扩增,与同时加入常规引物和扩增模板引物的人工序列模板引物集相比,其检测灵敏度可相差 10 ~ 100 倍。加入不同稀释度阳性样品在不同循环(Ct)出现荧光信号,而阴性样品及其他非特异对照样品(含有其他病原体的样品)在扩增反应结束时(Ct>40)时均未出现荧光信号。

实施例 7

结核杆菌 rpoB SNPs 检测平台构建

30 结核杆菌常引起人和家畜发生结核,是当前重要的难以控制的传染病之一。结核杆菌的 rpoB 基因常发生点突变,表现为单核苷酸多态性(SNPs)。这些 SNPs 是结核耐药的主要原因,而结核的耐药是其预防和治疗的一大难题。选择结核 rpoB 基因并检测其 SNPs,从基因水平发现并预测结核的耐药,具有重要的社会效益和经济效益。

针对 rpoB 基因的 SNPs,设计了数十对引物。这些引物含有通用探针模板序列和与 rpoB 35 基因突变位点对应的引物和对照引物,引物的 3' 端按特定要求予以设计。所以与突变位点对应的扩增反应均在同一条件下在 PE5700 荧光实时 PCR 仪上进行。结果与预期相符,即在同一扩增条件下可识别被检测突变是否发生,发生在何处,以及发生了怎样的突变。

该平台技术的构建说明 UniArray 矩阵技术可行,可用于大规模、高通量的 SNPs 检测。

40 1、引物设计(不含公用引物区)

结核杆菌 rpoB 的突变位点集中在氨基酸序列的 511, 513, 516, 526, 531 等位点

的单核苷酸突变。针对这些位点设计设计符合要求的常规引物和人工序列模板引物。

常规引物 1 :

5'-CAATCAAGGA GTTCTTCGGC A- 3' (SEQ ID NO:12)

常规引物 2 :

5 5'-GGCAGCTCA AGTGACAGAC- 3' (SEQ ID NO:13)

人工序列模板引物 1(511 位点 T: C 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACATC TTGGACCATG AATTGGCTCG- 3' (SEQ ID NO:14)

人工序列模板引物 2 (513 位点 A:T 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACATT CGGGTTCTCG TCCATGAATA- 3' (SEQ ID NO:15)

10 人工序列模板引物 3(516 位点 A:T 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTAT TGACAGCGGG TTGTTCTGGA- 3' (SEQ ID NO:16)

人工序列模板引物 4(516 位点 G:T 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACATT GACAGCGGGT TGTTCTGGTA- 3' (SEQ ID NO:17)

人工序列模板引物 5(为人工序列模板引物 1 的对照引物):

15 5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACATC TTGGACCATG AATTGGCTCA- 3' (SEQ ID NO:18)

人工序列模板引物 6(为人工序列模板引物 2 的对照引物):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACAGG GTTGTCTCG TCCATGAATT- 3' (SEQ ID NO:19)

人工序列模板引物 7(为人工序列模板引物 3 的对照引物):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTAT TGACAGCGGG TTGTTCTGGT- 3' (SEQ ID NO:20)

20 人工序列模板引物 8(为人工序列模板引物 4 的对照引物):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACATT GACAGCGGGT TGTTCTGGTC- 3' (SEQ ID NO:21)

人工序列模板引物 9(526 位点 A:C 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTGCTGTCTGA GGTGACCCC- 3' (SEQ ID NO:22)

人工序列模板引物 10(526 位点 C:T 突变):

25 5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTCGCTGTCG TGGTTGACCT- 3' (SEQ ID NO:23)

人工序列模板引物 11(526 位点 C:A 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTCGCTGTCG AGGTTGACCA- 3' (SEQ ID NO:24)

人工序列模板引物 12(526 位点 C:G 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTCGCTGTCG AGGTTGACCG- 3' (SEQ ID NO:25)

30 人工序列模板引物 13(526 位点 A:G 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTGCTGTCTGA GGTGACCCG- 3' (SEQ ID NO:26)

人工序列模板引物 14(526 位点 C:G 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCT TGCTGTCTGAG GTTGACCCAG- 3' (SEQ ID NO:27)

人工序列模板引物 15(5311 位点 C:T 突变):

35 5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTCCTCAAGC GCCGACTGTT- 3' (SEQ ID NO:28)

人工序列模板引物 16(531 位点 C:G 突变):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTCCTCAAGC GCCGACTGTG- 3' (SEQ ID NO:29)

人工序列模板引物 17(人工序列模板引物 9, 13 的对照引物):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTTACTC ATTGCTGTCG AGGTTGACCC- 3' (SEQ ID NO:30)

40 人工序列模板引物 18(人工序列模板引物 10, 11, 12 的对照引物):

5'-TTGTTGCGCA TTCCGTTTCGC ATACTACTCA TTGCTGTCTGA GGTGACCCA- 3' (SEQ ID NO:31)

人工序列模板引物 19(人工序列模板引物 14 的对照引物):

5'-TTGTTTCGCCA TTCCGTTCGC ATACTCTCAT TGCTGTCGAG GTTGACCCAC- 3' (SEQ ID NO:32)

人工序列模板引物 20(人工序列模板引物 15, 16 的对照引物):

5'-TTGTTTCGCCA TTCCGTTCGC ATACTACTCA TTCCTCAAGC GCCGACTGTC- 3' (SEQ ID NO:33)

使用的 Taqman 探针序列:

5'-TTGTTTCGCCA TTCCGTTCGC- 3' (SEQ ID NO:34)

其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素(6-FAM)(位于 5' 端的), 猝灭基团是 6-羧基-四甲基罗丹明(TAMRA)(位于 3' 端的)。

2、PCR 方案

PCR 方案: 94 °C, 5 分钟; 94 °C 20 秒和 61 °C 40 秒, 共 40 个循环。其中使用的样品为克隆在 pUC 质粒上的野生型和各突变型序列, 将上述人工序列模板引物集加入 96 孔 PCR 扩增基板, 并使用透明封盖, 在 ABI GeneAmp 5700 荧光基因扩增仪上进行扩增并实时检测。其激发光源为卤素灯, 波长为 488nm。用上述引物及相应的 Taqman 探针在 ABI5700 基因扩增仪进行扩增。

3、判别模式

以不同样品在 ABI 5700 荧光 PCR 仪检测到荧光的循环数(Ct)来判断是否产生突变。结果如下表所示, Ct_{wc} 指野生型样品(未突变)加入对照人工序列模板引物集(未突变引物)中反应得到的循环数; Ct_{wc} 指野生型样品(未突变)加入突变的人工序列模板引物集(含突变引物)中反应得到的循环数; Ct_{mc} 指突变样品加入对照人工序列模板引物集(未突变引物)中反应得到的循环数; Ct_{me} 指突变样品加入突变的人工序列模板引物集(含突变引物)中反应得到的循环数。

| | 对照引物(c) | 突变引物(e) |
|----------|------------------|------------------|
| 野生型质粒(w) | Ct _{wc} | Ct _{wc} |
| 突变型质粒(m) | Ct _{mc} | Ct _{me} |

Ct_{wc}>Ct_{wc}, Ct_{me}>Ct_{mc}, 为判定阳性结果的充分条件; Ct_{wc}>Ct_{mc}, Ct_{wc}<Ct_{me}, 为判定阳性结果的必要条件。

如上述充分条件满足或充分条件和必要条件均满足, 则判为阳性(检测的突变正确); 如不能满足充分条件, 判为阴性(检测的突变未发生); 如满足充分条件, 而必要条件未满足, 需要对引物进行优化。

4、结果

以野生型模板作为对照模板, 突变序列为实验模板。加入等量的模板和等量的相应引物。在 ABI 5700 荧光定量 PCR 仪上进行扩增和荧光实时检测。加入不同样品的反应孔在不同循环(Ct)出现荧光信号(Ct<40)或未出现荧光信号(Ct>40)。根据上述判别模式, 检测出各突变点, 并判别出突变的类型。

实验结果与预期相符, 即在同一扩增条件下可识别不同的被检测突变是否发生, 发生在何处, 以及发生了怎样的突变。该平台技术在目前已有的 96 孔 PCR 基板的成功实现说明均相基因矩阵技术的可行性, 即可用于大规模、高通量的单核苷酸多态性(SNPs)、基因突

变的检测。

实施例 8

结核杆菌 rpoB SNPs 双突变检测技术平台建立

- 5 在发生某些特殊突变, 如 C:T 突变时, 突变引物与对照野生型引物扩增的效率变化不大, 小于 10^{-2} , 检测时不易区分突变是否发生(需做大量优化)。为了达到使 PCR 易于区分这类突变, 在设计突变引物时, 除 3' 末端的碱基发生突变外, 可在其 3' 末端第二位或第三位碱基进行人为突变。突变的结果使该引物在扩增突变序列时, 在引物和模板之间, 其 3' 末端碱基互补, 但第二位或第三位的碱基错配, 引物仍能向前延伸并扩增靶序列; 但该引物在扩增野生型序列时, 除引物 3' 末端与模板序列不匹配外, 其相邻的第二位或第三位碱基也不匹配, 使其无法对野生型靶序列进行扩增。反之, 在野生型引物设计时加入第二位或第三位的人为突变, 可使该引物仅扩增野生型模板, 而几乎不扩增突变的样品序列。

在本实例中, 我们挑选 TB rpoB 基因的 531 位点的 C: T 突变作为检测靶位。

引物(含公用引物):

- 15 人工序列模板引物 1: (含 531 位点 C:T 突变, 并突变 3' 末端第二位 T 为 A)

5'-ACAGACCAGA GACCCAGAGA TTGTTCCGCA TTCCGTTCGC ATACTACTCA TTCCTCAAGC
GCCGACTGAT-3' (SEQ ID NO:35)

人工序列模板引物 2: (野生型引物, 人为突变 3' 末端第二位 T 为 A)

- 20 5'-ACAGACCAGA GACCCAGAGA TTGTTCCGCA TTCCGTTCGC ATACTACTCA TTCCTCAAGC
GCCGACTGAC-3' (SEQ ID NO:36)

公用引物:

5'-ACAGACCAGA GACCCAGAG-3' (SEQ ID NO: 37)

常规引物:

5'-GGCACGCTCA AGTGACAGAC-3' (SEQ ID NO:13)

- 25 使用的 Taqman 探针序列:

5'-TTGTTCCGCA TTCCGTTCGC- 3' (SEQ ID NO:34)

其中使用的报告基团是 6-羧基荧光素(6-FAM)(位于 5' 端的), 猝灭基团是 6-羧基-四甲基罗丹明(TAMRA)(位于 3' 端的)。

- 30 1、PCR 方案 同实施例 7。

2、判别模式 同实施例 7。

3、结果

- 35 经过双突变设计后, 对应于突变模板, 人工序列模板引物 1 的扩增效率明显高于人工序列模板引物 2(Ct=40)的扩增效率。对于野生型模板, 人工序列模板引物 1(Ct=40)的扩增效率则明显低于人工序列模板引物 2 的扩增效率。可直接区分突变是否存在, 以及发生何种突变。

此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种均相基因矩阵，其特征在于，它包括：

一基板，所述基板上具有 4-100,000 个反应孔；

5 在至少一个所述的反应孔内具有人工序列模板引物集，所述引物集包括：特异性结合于被检测核酸序列并引发目的核酸扩增反应的寡核苷酸引物对，其中至少一个引物是人工序列模板引物，该人工序列模板引物包括：

(a) 特异结合区，该特异结合区位于人工序列模板引物 3'端，用于与被检测核酸序列特异性结合；

10 (b) 公用区，该公用区位于人工序列模板引物的 5'端并且具有报告分子结合区和公用引物区，报告分子可特异性结合于该报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链，且所述的报告分子在下列两种情况下的状态不同，从而产生可检测的信号：(i) 结合于报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链，和(ii) 报告分子被切断或被取代。

15 2. 如权利要求 1 所述的均相基因矩阵，其特征在于，所述基板上还设为对照区，所述对照区有至少一个反应孔，用于放置对照试剂。

3. 如权利要求 1 所述的均相基因矩阵，其特征在于，所述的基板是 96 孔板和由光纤束，所述的光纤束由末端有反应池的光纤组成。

4. 如权利要求 1 所述的均相基因矩阵，其特征在于，还包括一封闭件，用于封闭基板的反应孔。

20 5. 如权利要求 4 所述的均相基因矩阵，其特征在于，所述的封闭件是薄膜、透明封盖、石蜡。

6. 如权利要求 1 所述的人工序列模板引物集，其特征在于，所述的报告分子包括：荧光共振能量转移型信号探针、和含稀土元素的寡核苷酸链。

25 7. 如权利要求 6 所述的人工序列模板引物集，其特征在于，所述的特异结合区长度为 6-35bp，所述公用区的长度为 8-100bp，且所述的荧光共振能量转移型信号探针选自下组：Taqman 探针、FRET 双探针、分子信标和 PNA 信号探针，且在特异结合区和报告分子结合区之间存在间隔区，和/或在公用引物区和报告分子结合区之间存在间隔区，所述的间隔区为 1-20bp。

30 8. 如权利要求 1 所述的人工序列模板引物集，其特征在于，在所述的人工序列模板引物中含有选自下组的核苷酸：isoG、isoC、2'-O-甲基-G、2'-O-甲基-C、抗原分子或生物素标记的核苷酸、及其组合。

9. 如权利要求 1 所述的人工序列模板引物集，其特征在于，还包括用于增加被检测

核酸模板数量的扩增模板引物。

10. 一种检测核酸检测方法，其特征在于，它包括步骤：

(1) 将样品加至一基板，所述基板上具有 4-100,000 个反应孔；在至少一个所述的反应孔内具有人工序列模板引物集，所述引物集包括：特异性结合于被检测核酸序列并
5 引发目的核酸扩增反应的寡核苷酸引物对，其中至少一个引物是人工序列模板引物，该人工序列模板引物包括：

(a) 特异结合区，该特异结合区位于人工序列模板引物 3'端，用于与被检测核酸序列特异性结合；

(b) 公用区，该公用区位于人工序列模板引物的 5'端并且具有报告分子结合区和公用
10 引物区，报告分子可特异性结合于该报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链，且所述的报告分子在下列两种情况下的状态不同，从而产生可检测的信号：(i) 结合于报告分子结合区或该报告分子结合区的互补链，和(ii) 报告分子被切断或被取代。

(2) 在特异性条件下进行核酸扩增反应，

(3) 检测报告分子所产生的可检测信号。

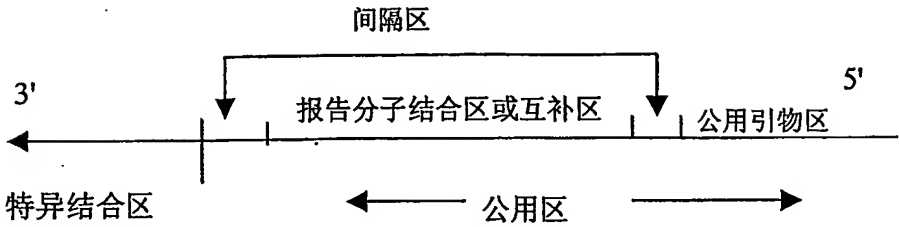


图 1A

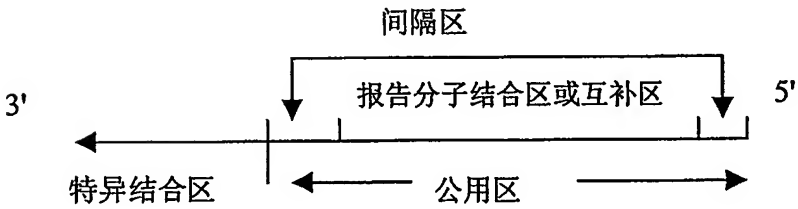


图 1B

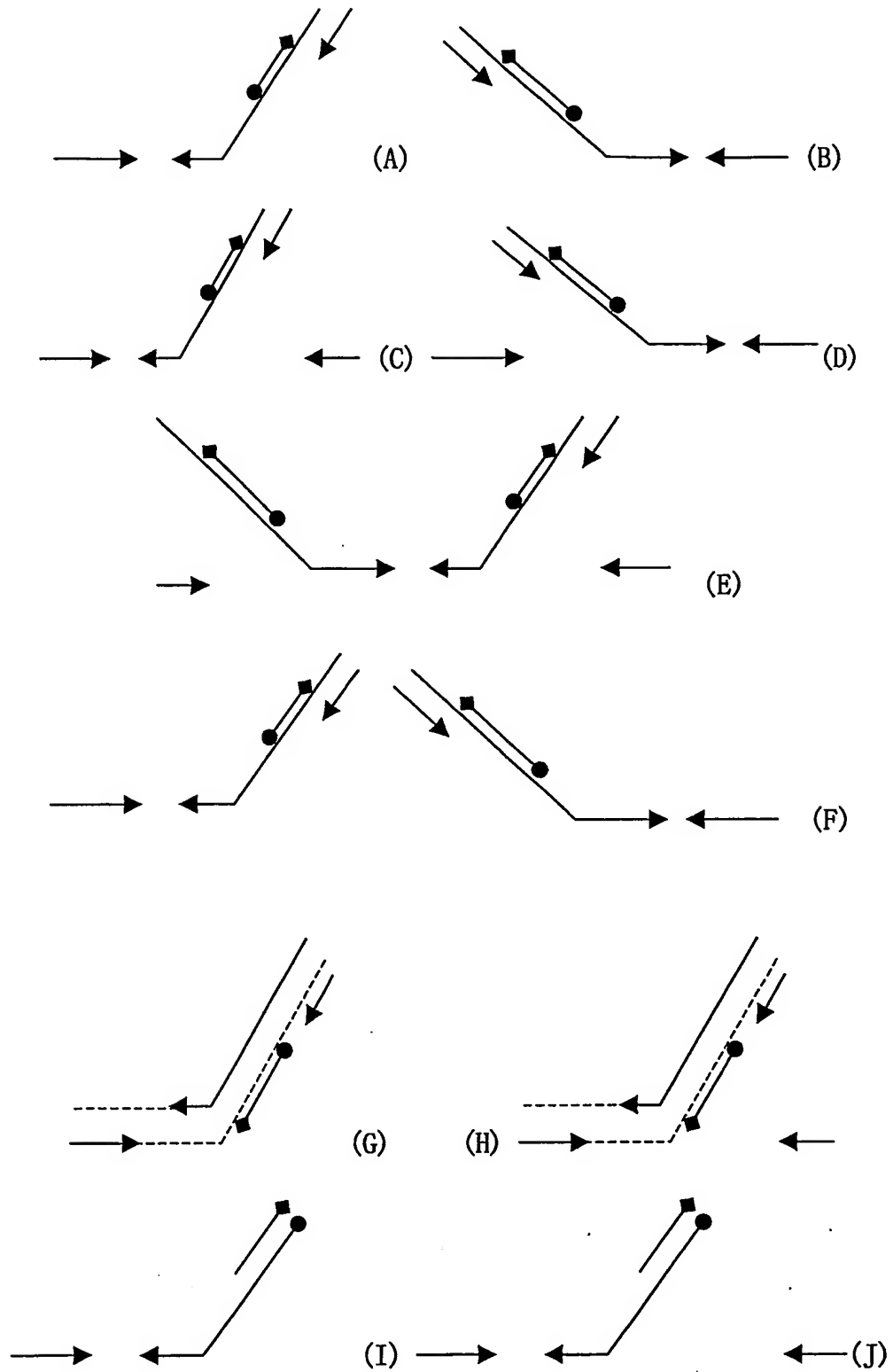


图 2

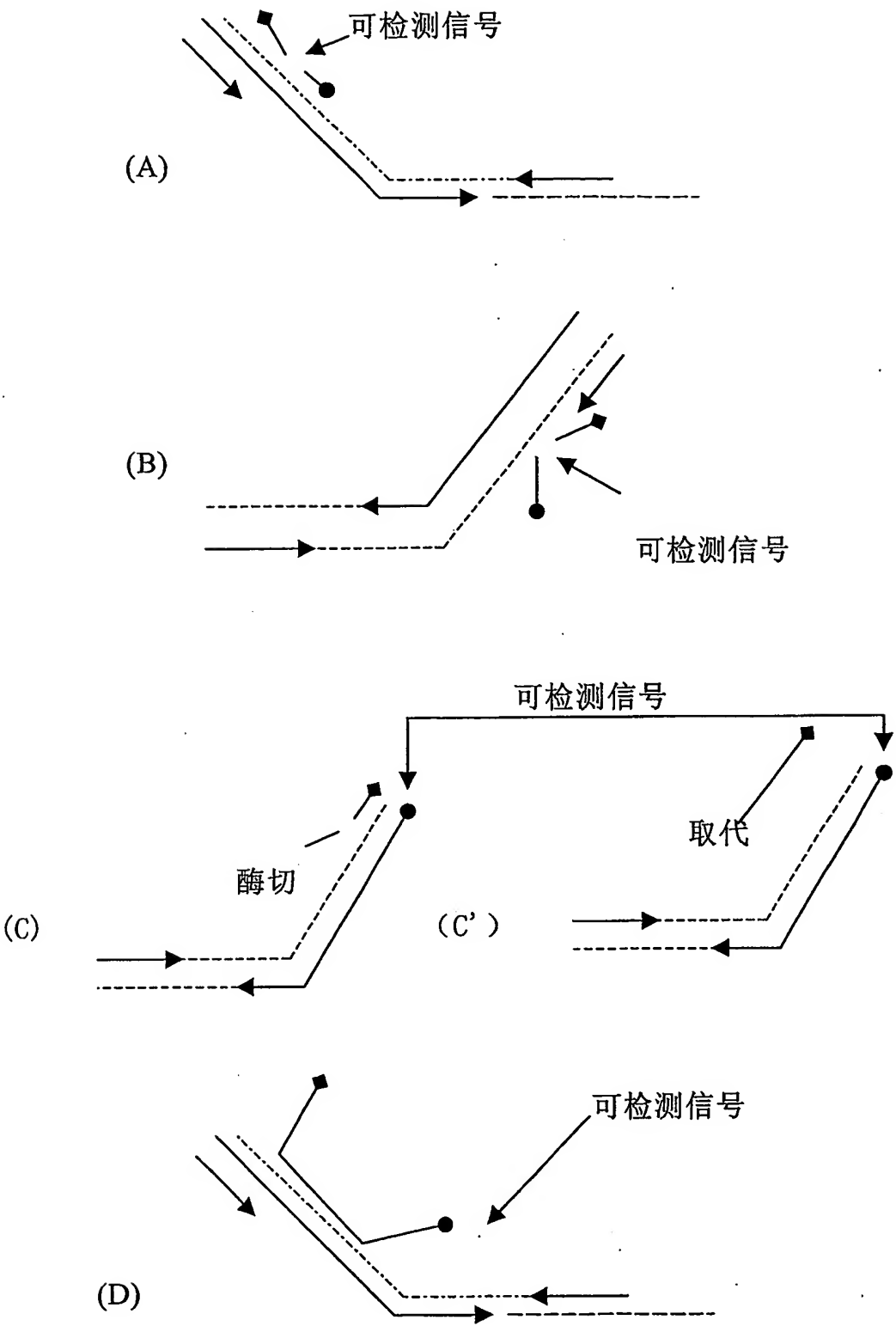


图 3

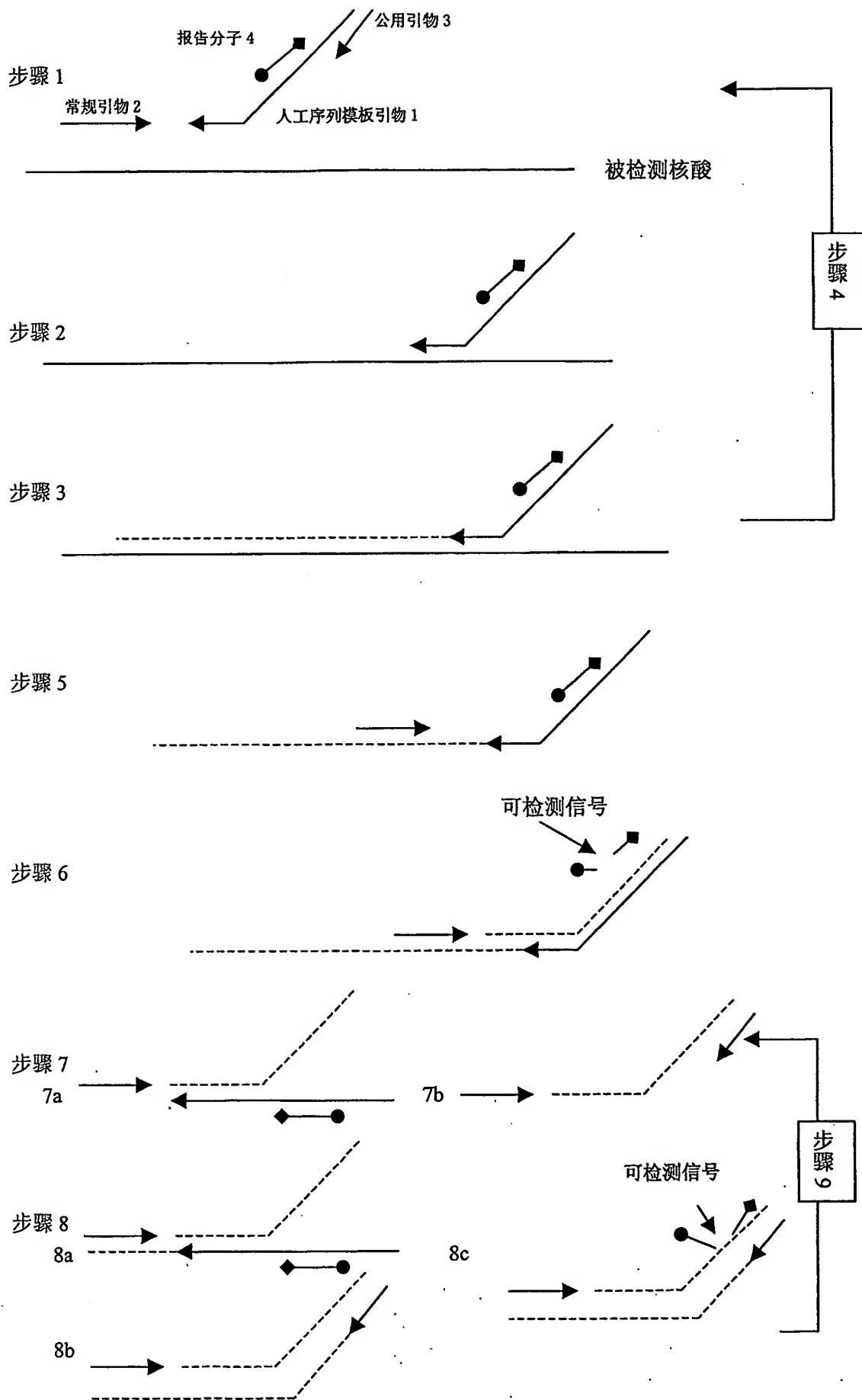


图 4

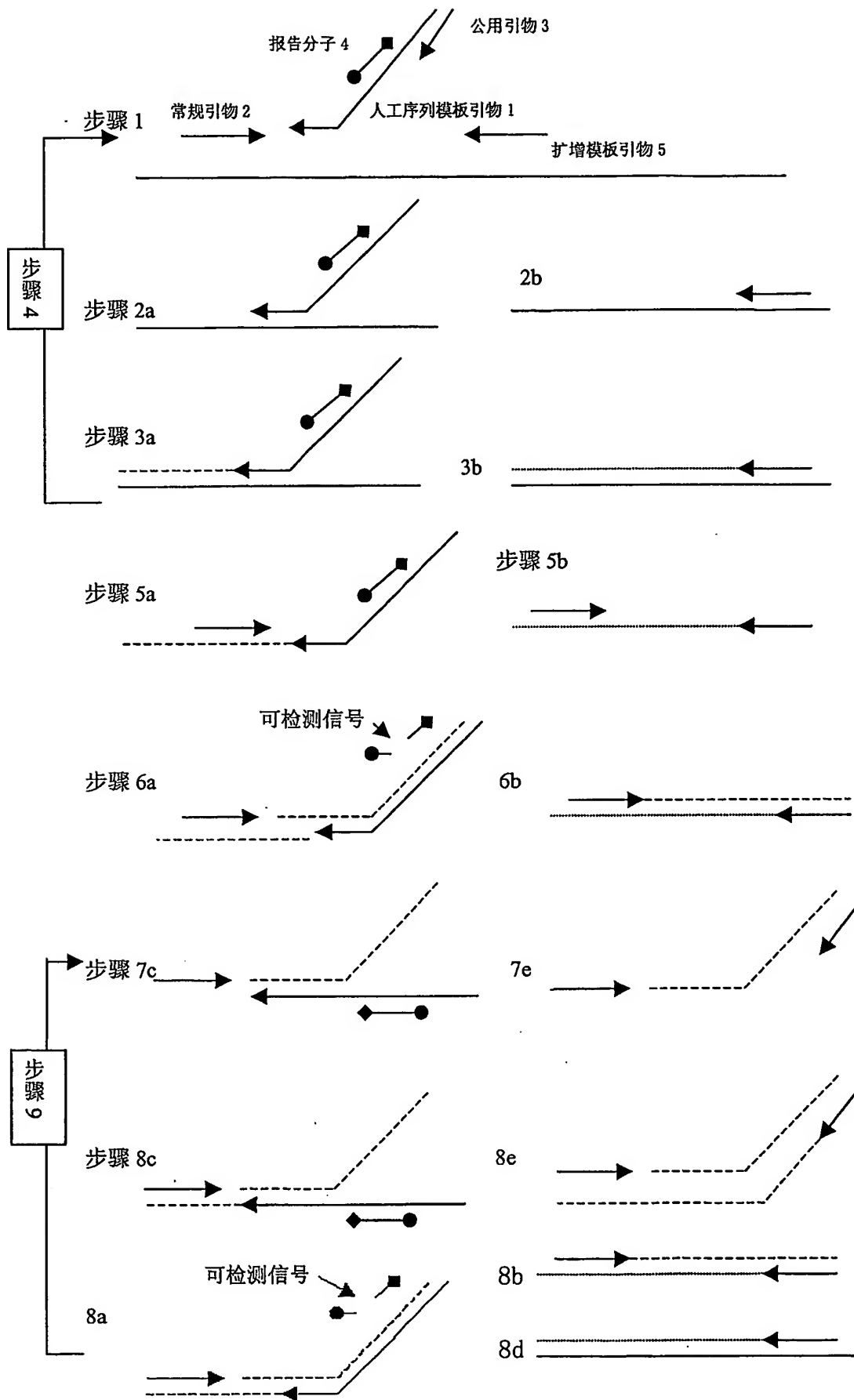


图 5

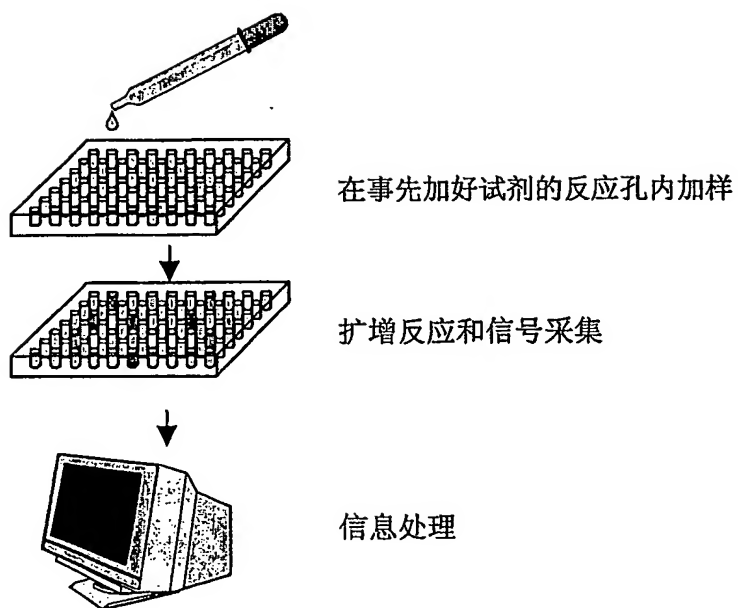


图 6

序列表

<110> 曹, 卫

<120> 均相基因矩阵

<130> 014339

<150> CN 01126578.7

<151> 2001-08-29

<160> 37

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> 合成的引物

<400> 1

aaggaacagg cggcgacgaa tcaacgacag aacgcaaccc aacgtactc

50

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> 合成的引物

<400> 2

gtgccccgc aagact

16

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 合成的引物

<400> 3

tcgtcgccgc ctgttcctta

20

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> 合成的引物

<400> 4

aaggaacagg cggcgacgaa tcaacgacag aaccagcgat agccaggaca

50

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 合成的引物

<400> 5

cctccaatca ctcaccaacc

20

<210> 6
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 6
 tcattccacat cccacctcat caggaacagg cggcgacgaa tcaacgacag aacgcaaccc 60
 aacgctactc 70

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 7
 tcattccacat cccacctcat 20

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 8
 tgagtgtcgt acagcctcca gg 22

<210> 9
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 9
 tcattccacat cccacctcat caggaacagg cggcgacgaa tcattccagtc tatgtttccc 60
 tcttgttgct 70

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 10
 agtttccgctc cgaaggttt 19

<210> 11
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 11
 aaggaacagg cggcgacgaa tcaacgacag aacgcaaccc aacgctactc 50

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 12
caatcaagga gttcttcggc a

21

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 13
ggcacgctca agtgacagac

20

<210> 14
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 14
ttgttcgcca ttccgttcgc atactacatc ttggaccatg aattggctcg

50

<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 15
ttgttcgcca ttccgttcgc atactacatt cgggttctcg tccatgaata

50

<210> 16
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 16
ttgttcgcca ttccgttcgc atactactat tgacagcggg ttgttctgga

50

<210> 17
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 17
ttgttcgcca ttccgttcgc atactacatt gacagcgggt tgttctgga

50

<210> 18
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

| | |
|--|----|
| <400> 18 | |
| ttgttcgccca ttccgttcgc atactacatc ttggaccatg aattggctca | 50 |
| <210> 19 | |
| <211> 50 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的引物 | |
| <400> 19 | |
| ttgttcgccca ttccgttcgc atactacagg gttgttctcg tccatgaatt | 50 |
| <210> 20 | |
| <211> 50 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的引物 | |
| <400> 20 | |
| ttgttcgccca ttccgttcgc atactactat tgacagcggg ttgttctggt | 50 |
| <210> 21 | |
| <211> 50 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的引物 | |
| <400> 21 | |
| ttgttcgccca ttccgttcgc atactacatt gacagcgggt tgttctggtc | 50 |
| <210> 22 | |
| <211> 50 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的引物 | |
| <400> 22 | |
| ttgttcgccca ttccgttcgc atactactca ttgctgtcga gggttgacccc | 50 |
| <210> 23 | |
| <211> 50 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的引物 | |
| <400> 23 | |
| ttgttcgccca ttccgttcgc atactactca ttcgtgtcg tggttgacct | 50 |
| <210> 24 | |
| <211> 50 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的引物 | |
| <400> 24 | |
| ttgttcgccca ttccgttcgc atactactca ttcgtgtcg aggttgacca | 50 |
| <210> 25 | |

<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 25
ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttgctgtcg aggttgaccg 50

<210> 26
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 26
ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttgctgtcga ggttgacccg 50

<210> 27
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 27
ttgttcgcca ttccgttcgc atactactct tgcgtgtcgag gttgaccag 50

<210> 28
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 28
ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttcctcaagc gccgactgtt 50

<210> 29
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 29
ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttcctcaagc gccgactgtg 50

<210> 30
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 30
ttgttcgcca ttccgttcgc atacttactc attgctgtcg aggttgaccc 50

<210> 31
<211> 50
<212> DNA
<213> 合成的引物

<400> 31

ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttgctgtcga ggttgaccca 50

<210> 32
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 32
 ttgttcgcca ttccgttcgc atactctcat tgctgtcgag gttgaccac 50

<210> 33
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 33
 ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttcctcaagc gccgactgtc 50

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 34
 ttgttcgcca ttccgttcgc 20

<210> 35
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 35
 acagaccaga gaccagaga ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttcctcaagc 60
 gccgactgat 70

<210> 36
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 36
 acagaccaga gaccagaga ttgttcgcca ttccgttcgc atactactca ttcctcaagc 60
 gccgactgac 70

<210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的引物

<400> 37
 acagaccaga gaccagag 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00591

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ G01N33/53 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ G01N33/53 C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | CN1248702A 29 Mar 2000, Refer to the Whole Document | 1-10 |
| A | WO0148242A2 05 July 2001, Refer to the Whole Document | 1-10 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

| | |
|--|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
04 Dec 2002(04.12.02)

Date of mailing of the international search report
19 DEC 2002 (19.12.02)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
Guo Xiaoyong
Telephone No. 8610-62093435

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT / CN02/00591

WO0148242A2

Publishing Date: 05 July 2001

Patent family members:

US2001036632A1 Publishing Date: 01 Nov 2001

AU200122828A Publishing Date: 09 July 2001

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN02/00591

A. 主题的分类

IPC⁷ G01N33/53 C12Q1/68

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ G01N33/53 C12Q1/68

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

CNPAT WPI EPODOC NCBI

C. 相关文件


| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求编号 |
|------|-------------------------------|-----------|
| A | CN1248702A 29.3 月 2000, 参见全文 | 1-10 |
| A | WO0148242A2 05.7 月 2001, 参见全文 | 1-10 |

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利
“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性
“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性
“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期
04.12 月 2002(04.12.02)国际检索报告邮寄日期
19.12月2002(19.12.02)国际检索单位名称和邮寄地址
ISA/CN
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)
传真号: 86-10-62019451授权官员

电话号码: 86-10-62093435

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN02/00591

| 检索报告中引用的 专利文件 | 公布日期 | 同族专利成员 | 公布日期 |
|------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------------|
| WO0148242A2 | 05.7 月 2001 | US2001036632A1 AU200122828A | 01.11 月 2001 09.7 月 2001 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.